

Rec'd PCT/PTO 03 DEC 2004

10/516587

PCT/JP 03/06807

日本国特許庁  
JAPAN PATENT OFFICE

15.07.03

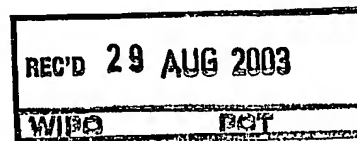
別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日  
Date of Application: 2002年 6月 6日

出願番号  
Application Number: 特願2002-165722  
[ST. 10/C]: [JP 2002-165722]

出願人  
Applicant(s): 鐘淵化学工業株式会社

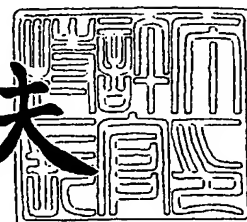


**PRIORITY  
DOCUMENT**  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1 (a) OR (b)

2003年 8月14日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

今井康夫



【書類名】 特許願

【整理番号】 TKS-4797

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12N 9/80

【発明者】

    【住所又は居所】 兵庫県神戸市垂水区塩屋町 6 - 3 1 - 1 7

    【氏名】 大久保 聡子

【発明者】

    【住所又は居所】 兵庫県龍野市神岡町大住寺 7 5 0 - 7

    【氏名】 真野 拓巳

【発明者】

    【住所又は居所】 兵庫県高砂市高砂町沖浜町 4 - 3 - 1 1

    【氏名】 横田 真一

【特許出願人】

    【識別番号】 000000941

    【氏名又は名称】 鐘淵化学工業株式会社

【代理人】

    【識別番号】 100086586

    【弁理士】

    【氏名又は名称】 安富 康男

【選任した代理人】

    【識別番号】 100115141

    【弁理士】

    【氏名又は名称】 野田 慎二

【手数料の表示】

    【予納台帳番号】 033891

    【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

    【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 0003934

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書  
【発明の名称】 新規アシラーゼ遺伝子  
【特許請求の範囲】

【請求項1】 ステノトロフォモナス (*Stenotrophomonas*) 属に属する微生物が産生する  $\beta$ -ラクタムアシラーゼ。

【請求項2】 ステノトロフォモナス マルトフィリア (*Stenotrophomonas maltophilia*) KNK12株が産生する  $\beta$ -ラクタムアシラーゼ。

【請求項3】 配列番号2で示されるアミノ酸配列と同一又は実質的に同一のアミノ酸配列からなるタンパク質をコードするDNAからなる遺伝子。

【請求項4】 配列番号2で示されるアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ  $\beta$ -ラクタムアシラーゼ活性を有するタンパク質をコードするDNAからなる遺伝子。

【請求項5】 配列番号2で示されるアミノ酸配列において、翻訳後修飾され、かつ  $\beta$ -ラクタムアシラーゼ活性を有するタンパク質をコードするDNAからなる遺伝子。

【請求項6】 配列番号1で示される塩基配列において、配列番号2で示されるアミノ酸配列をコードする部分に対応する塩基配列が、配列番号2で示されるアミノ酸配列と同じアミノ酸配列をコードするDNAからなる遺伝子。

【請求項7】 ステノトロフォモナス (*Stenotrophomonas*) 属に属する微生物から単離された請求項3～6のいずれかに記載の遺伝子。

【請求項8】 配列番号2で示されるアミノ酸配列と同一又は実質的に同一のアミノ酸配列からなるタンパク質を生産し、ステノトロフォモナス (*Stenotrophomonas*) 属に属する微生物。

【請求項9】 配列番号2で示されるアミノ酸配列と同一又は実質的に同一のアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする塩基配列からなるポリヌクレオチド。

【請求項10】 配列番号2で示されるアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ  $\beta$ -ラク

タムアシラーゼ活性を有するタンパク質をコードする塩基配列からなるポリヌクレオチド。

【請求項 11】 配列番号 2 で示されるアミノ酸配列において、翻訳後修飾され、かつ  $\beta$ -ラクタムアシラーゼ活性を有するタンパク質をコードする塩基配列からなるポリヌクレオチド。

【請求項 12】 配列番号 1 で示される塩基配列において、配列番号 2 で示されるアミノ酸配列をコードする部分に対応する塩基配列が、配列番号 2 で示されるアミノ酸配列と同じアミノ酸配列をコードする塩基配列からなるポリヌクレオチド。

【請求項 13】 配列番号 1 で示される塩基配列からなるポリヌクレオチド。

【請求項 14】 ステノトロフォモナス (*Stenotrophomonas*) 属に属する微生物から単離された請求 9 ~ 13 のいずれかに記載のポリヌクレオチド。

【請求項 15】 配列番号 2 のアミノ酸配列と同一又は実質的に同一のアミノ酸配列からなるタンパク質。

【請求項 16】 配列番号 2 のアミノ酸配列において 1 もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ  $\beta$ -ラクタムアシラーゼ活性を有するタンパク質。

【請求項 17】 配列番号 2 で示されるアミノ酸配列において、翻訳後修飾され、かつ  $\beta$ -ラクタムアシラーゼ活性を有するタンパク質。

【請求項 18】 請求項 3 ~ 7 のいずれかに記載の遺伝子に含まれる転写調節配列。

【請求項 19】 請求項 3 ~ 7 のいずれかに記載の遺伝子に含まれる翻訳調節配列。

【請求項 20】 転写及び／又は翻訳調節配列を含むレギュロンの制御下にある請求項 3 ~ 7 のいずれかに記載の遺伝子であって、当該調節配列の一方又は両方がそれぞれ同じ又は異なる生物から得られた他の転写及び／又は翻訳調節配列に置き換えられている遺伝子。

【請求項 21】 請求項 3、4、5、6、7 又は 20 に記載の遺伝子を 1 以上含

む組換えベクター。

【請求項 22】 請求項 21 記載の組換えベクターで宿主を形質転換してなる形質転換体。

【請求項 23】 宿主がグラム陰性微生物である請求項 22 記載の形質転換体。

【請求項 24】 宿主がグラム陽性微生物である請求項 22 記載の形質転換体。

【請求項 25】 請求項 22～24 のいずれかに記載の形質転換体を培養し、当該形質転換体が産生した  $\beta$ -ラクタムアシラーゼを回収することを特徴とする、 $\beta$ -ラクタムアシラーゼの製造方法。

【請求項 26】 請求項 9～14 のいずれかに記載のポリヌクレオチドによりコードされたアミノ酸配列からなる  $\beta$ -ラクタムアシラーゼ。

【請求項 27】 請求項 8 記載の微生物、または請求項 22～24 のいずれかに記載の形質転換体を培養し、その菌体、菌体混合培養液、菌体の破碎物、もしくは、菌体から抽出精製された  $\beta$ -ラクタムアシラーゼ、を固定化してなる固定化  $\beta$ -ラクタムアシラーゼ。

【請求項 28】 請求項 21 記載の組換えベクターを調製し、当該組換えベクターで宿主を形質転換し、得られた形質転換体をクローン化し選択することからなる、形質転換体中で  $\beta$ -ラクタムアシラーゼを産生する又はその産生を増強する方法。

【請求項 29】 請求項 26 記載の  $\beta$ -ラクタムアシラーゼにより  $\beta$ -ラクタム系抗生物質を製造する方法。

【請求項 30】  $\beta$ -ラクタム系抗生物質がアモキシシリンである請求項 29 記載の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明はステノトロフォモナス (*Stenotrophomonas*) 属  $\beta$ -ラクタムアシラーゼをコードする DNA を有する遺伝子、当該遺伝子の塩基配列から予想されるタンパク質、当該遺伝子によりコードされた  $\beta$ -ラクタムアシラーゼ、当該遺伝子を有する組換えベクター、当該組換えベクターを含む形質転換体

、当該酵素の製造方法および当該酵素を用いた $\beta$ -ラクタム系抗生物質の生産方法に関する。

#### 【0002】

##### 【従来の技術】

アモキシシリン、アンピシリン、セファロスポリンをはじめとする多くの $\beta$ -ラクタム系抗生物質は、ペニシリウム (*Penicillium*) 属およびセファロスポリウム (*Cephalosporium*) 属等の菌類を培養することによって得られる発酵生成物を出発材料として製造されている。

たとえば、ペニシリン G (*Pen G*)、ペニシリン V (*Pen V*) あるいはセファロスポリン C からアミド結合を開裂 (脱アシル化) し、半合成ペニシリン及びセファロスポリンの工業的生産の最も重要な中間体である 6-アミノペニシラン酸 (6-APA) あるいは 7-アミノセファロスポラン酸 (7-ACA) を生産するために、ペニシリン G アシラーゼ (ペニシリン G アミダーゼとも称されるベンジルペニシリンアミドヒドロラーゼ、EC 3. 5. 1. 11) が産業上使用されている。この酵素は、*Pen G* から通常化学的に製造されるフェニルアセチル-7-アミノデアセトキシセファロスポラン酸の、7-アミノデアセトキシセファロスポラン酸 (7-ADCA) への変換にも工業的に使用されている。これら $\beta$ -ラクタム母核である 6-APA、7-ACA、7-ADCA と側鎖化合物との化学合成反応により製造された半合成ペニシリン類およびセファロスポリン類は、 $\beta$ -ラクタム系抗生物質の重要な市場を形成している。

#### 【0003】

従来 $\beta$ -ラクタム母核生産での脱アシル化において有用な酵素は、加水分解酵素として分類され、当該分野においては通常「アシラーゼ」もしくは「アミダーゼ」と呼ばれている。これらアシラーゼ酵素の中でも $\beta$ -ラクタム系抗生物質を基質として認識するものは、さらに「 $\beta$ -ラクタムアシラーゼ」として特定されている。この $\beta$ -ラクタムアシラーゼの活性には、アシル基が水によって脱離する場合の加水分解 (脱アシル) 活性と、その可逆反応である活性化された側鎖基質から求核物質へのアシル基の転移を触媒する転移活性がある。この化学的形態は次の一般式によって表される。すなわち、特定のアシラーゼによって基質として

受け入れられる化合物： $X-CO-NH-Y$ における該化学的形態 $X$ および $Y$ の特性は、該当するアシラーゼの基質特異性によって決定される。 $X$ は側鎖を表し、一方 $Y$ はアシルアクセプタ基を表している。例えば、Pen Gの場合 $X-CO$ はフェニルアセチル側鎖を表し、かつ $-NH-Y$ は6-APAを表している。これら $\beta$ -ラクタムアシラーゼは、 $\beta$ -ラクタム系抗生物質の生産において、アシル基転移反応工程を化学合成法から酵素法へ転換する可能性があることにより注目されているが、いまだ生産効率が悪い点から実用化には至っていない。

#### 【0004】

$\beta$ -ラクタムアシラーゼは、基質特異性や分子的特徴において以下のように分類されている (Process Biochemistry, 27, 131, 1992、World J. Microbiology & Biotechnology, 10, 129, 1994)。 $\beta$ -ラクタムアシラーゼは大きく分けて、ペニシリンアシラーゼとセファロスポリンアシラーゼに分類され、さらにペニシリンアシラーゼはペニシリンGアシラーゼと、ペニシリンVアシラーゼ、アンピシリンアシラーゼに細分類され、セファロスポリンアシラーゼは、セファロスポリンアシラーゼとグルタリル-7-ACA (GL-7-ACA) アシラーゼに細分類される。

#### 【0005】

これまで6-APA生産等で産業上利用されてきたペニシリンGアシラーゼは小サブユニット ( $\alpha$ : 16-26 kDa) と大サブユニット ( $\alpha$ : 54-66 kDa) からなるヘテロ2量体を形成しており、一方ペニシリンVアシラーゼは分子量35 kDaのサブユニットの4量体、また、アンピシリンアシラーゼは分子量72 kDaのホモ2量体の形成が知られている。また、基質特異性より、 $\alpha$ アミノ酸ヒドロラーゼという名前をもつものもあるが、この場合も化学反応の形態では上記アシラーゼ活性に含まれる。

#### 【0006】

これらアシラーゼのうちペニシリンGアシラーゼをコードしている微生物のアシラーゼ遺伝子配列が明らかにされている。即ち、イーコリ (E. coli) (Nucleic Acids Res., 14 (14), 5713, 1996)、

クルイベラ シトロフィリア (*Kluyvera citrophila*) (Gene, 49, 69, 1986)、アルカリゲネス フェカリス (*Alcaligenes faecalis*) (特開平4-228073)、プロビデンシア レテゲリ (*Providencia rettgeri*) (DNA seq., 3, 195, 1992)、アリスロバクター ビスコサス (*Arthrobacter viscosus*) (Appl. Environ. Microbiol., 54, 2603, 1988)、アーケオグロバス フルギダス (*Archaeoglobus fulgidus*) (Nature, 390, 364, 1997)、バチルス メガテリウム (*Bacillus megaterium*) (FEMS Microbiol. Lett. 125, 287, 1995) 等である。また、ヘテロ2量体構造を持つ、GL-7-ACAアシラーゼはシュードモナス (*Pseudomonas*) sp. (J. Ferment. Bioeng., 77, 591, 1994)、セファロスポリンアシラーゼはシュードモナス (*Pseudomonas*) sp. (J. Bacteriol., 163, 1222, 1985、J. Bacteriol., 169, 5821, 1987) 等が明らかにされている。

#### 【0007】

これらは遺伝子ファミリーとしてDNAレベルで明らかにされているため遺伝子クローニングは容易であり、また、微生物ゲノムライブラリーの酵素活性を指標にした方法によってスクリーニングすることによるDNA取得も容易に可能である。

#### 【0008】

##### 【発明が解決しようとする課題】

本発明が解決しようとする課題は、活性の高い $\beta$ -ラクタムアシラーゼタンパク質、当該 $\beta$ -ラクタムアシラーゼタンパク質をコードする遺伝子、当該遺伝子を有する組換えベクター、当該組換えベクターを含む形質転換体、および当該 $\beta$ -ラクタムアシラーゼを用いたアモキシシリン等の $\beta$ -ラクタム系抗生物質の製造方法を提供することである。従来のペニシリンGアシラーゼはアモキシシリン等の $\beta$ -ラクタム系抗生物質への合成効率が低く、またフェニル酢酸、フェノキシ

酢酸やアモキシシリンで合成活性が強く阻害されるため、これら性質が改善された酵素の出現が工業的に有利であるために求められていた。

#### 【0009】

##### 【課題を解決するための手段】

我々は6-アミノペニシラン酸(6-APA)とハイドロキシフェニルグリシンメチルエステル(HPGOMe)からアモキシシリンを効率よく生産する酵素を得ることを目的として様々な菌株を土壌よりスクリーニングした結果、グラム陰性細菌であるステノトロフォモナス(*Stenotrophomonas*)属に属する微生物が $\beta$ -ラクタムアシラーゼを生産することを見出した。この菌株から $\beta$ -ラクタムアシラーゼを精製し、さらにその遺伝子クローニングを行った。その結果、 $\beta$ -ラクタムアシラーゼ遺伝子をクローニングして配列番号1で示されるDNA塩基配列を決定した。該遺伝子のオープンリーディングフレームは1911塩基からなり、配列番号2で示される636アミノ酸配列からなる分子量約70kDaのタンパク質をコードしていることが判明した。さらに、該遺伝子を宿主中で発現させ、アシル化活性を有することを確認し、本発明を完成するに至った。

#### 【0010】

本発明の $\beta$ -ラクタムアシラーゼ生産菌はステノトロフォモナス(*Stenotrophomonas*)属に属し、本発明者らが土壌より分離したステノトロフォモナス マルトフィリア(*Stenotrophomonas maltophilia*) KNK12株は本発明に最も有効に使用される菌株の一例である。即ち、本発明は、ステノトロフォモナス(*Stenotrophomonas*)属に属する微生物が産生する $\beta$ -ラクタムアシラーゼ、およびステノトロフォモナス(*Stenotrophomonas*) KNK12株が産生する $\beta$ -ラクタムアシラーゼに関する。

#### 【0011】

さらに、配列番号2で示されるアミノ酸配列と同一又は実質的に同一のアミノ酸配列からなるタンパク質をコードするDNAからなる遺伝子に関し、また、配列番号2で示されるアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換

もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ $\beta$ -ラクタムアシラーゼ活性を有するタンパク質をコードするDNAからなる遺伝子に関し、さらに、配列番号2で示されるアミノ酸配列において、翻訳後修飾され、かつ $\beta$ -ラクタムアシラーゼ活性を有するタンパク質をコードするDNAからなる遺伝子に関する。

#### 【0012】

さらに、本発明は、配列番号1で示される塩基配列において、配列番号2で示されるアミノ酸配列をコードする部分に対応する塩基配列が、配列番号2で示されるアミノ酸配列と同じアミノ酸配列をコードするDNAからなる遺伝子に関する。また、ステノトロフォモナス (*Stenotrophomonas*) 属に属する微生物から単離された上記遺伝子に関する。

#### 【0013】

また、本発明は、配列番号2で示されるアミノ酸配列と同一又は実質的に同一のアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする塩基配列からなるポリヌクレオチド、および配列番号2で示されるアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ $\beta$ -ラクタムアシラーゼ活性を有するタンパク質をコードする塩基配列からなるポリヌクレオチド、および配列番号2で示されるアミノ酸配列において、翻訳後修飾され、かつ $\beta$ -ラクタムアシラーゼ活性を有するタンパク質をコードする塩基配列からなるポリヌクレオチド、および配列番号1で示される塩基配列において、配列番号2で示されるアミノ酸配列をコードする部分に対応する塩基配列が、配列番号2で示されるアミノ酸配列と同じアミノ酸配列をコードする塩基配列からなるポリヌクレオチド、および、ステノトロフォモナス (*Stenotrophomonas*) 属に属する微生物から単離された上記ポリヌクレオチドに関する。

#### 【0014】

さらに、本発明は、配列番号2のアミノ酸配列と同一又は実質的に同一のアミノ酸配列からなるタンパク質に関し、また、配列番号2のアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ $\beta$ -ラクタムアシラーゼ活性を有するタンパク質に関する。

#### 【0015】

さらに、配列番号 2 で示されるアミノ酸配列において、翻訳後修飾され、かつ  $\beta$ -ラクタムアシラーゼ活性を有するタンパク質に関する。

また、本発明は、上記遺伝子に含まれる転写調節配列；上記遺伝子に含まれる翻訳調節配列；転写及び／又は翻訳調節領域を含むレギュロンの制御下にある上記遺伝子であって、当該調節配列の一方または両方がそれぞれ同じ又は異なる生物から得られた他の転写及び／又は翻訳調節配列に置き換えられている遺伝子に関する。

#### 【0016】

さらに、本発明は、上記遺伝子を 1 以上含む組換えベクター、上記組換えベクターで宿主を形質転換してなる形質転換体、宿主がグラム陰性微生物である上記形質転換体、宿主がグラム陽性微生物である上記形質転換体に関する。

また、本発明は、上記形質転換体を培養し、当該形質転換体が産生した  $\beta$ -ラクタムアシラーゼを回収することからなる  $\beta$ -ラクタムアシラーゼの製造法に関し、上記ポリヌクレオチドによりコードされたアミノ酸配列からなる  $\beta$ -ラクタムアシラーゼにも関し、さらに、上記微生物または上記形質転換体を培養し、その菌体、菌体混合培養液、菌体の破碎物、もしくは、菌体から抽出精製された  $\beta$ -ラクタムアシラーゼ、を固定化してなる固定化  $\beta$ -ラクタムアシラーゼに関する。

#### 【0017】

さらに、上記組換えベクターを調製し、当該ベクターで宿主を形質転換し、得られた形質転換体をクローン化し選択することからなる、形質転換体中で  $\beta$ -ラクタムアシラーゼを産生するまたはその産生を増強する方法に関する。

また、本発明は、当該酵素を用いた、アモキシシリン等の  $\beta$ -ラクタム系抗生物質の製造方法に関する。

#### 【0018】

また、上記ポリヌクレオチドによりコードされたアミノ酸配列からなる  $\beta$ -ラクタムアシラーゼにより、アモキシシリン等の  $\beta$ -ラクタム系抗生物質を製造する方法に関する。

本発明のステノトロフォモナス (*Stenotrophomonas*) 属  $\beta$ -ラ

クタムアシラーゼ酵素は、報告されているイーコリ (*E. coli*) ペニシリン Gアシラーゼ (*Nucleic Acids Res.*, 14 (14), 5713, 1996)、クルイベラ シトロフィリア (*Kluyvera citrophila*) ペニシリン Gアシラーゼ (*Gene*, 49, 69, 1986)、アルカリゲネス フェカリス (*Alcaligenes faecalis*) ペニシリン Gアシラーゼ (特開平4-228073)、プロビデンシア レテゲリ (*Providencia rettgeri*) ペニシリン Gアシラーゼ (*DNA seq.*, 3, 195, 1992)、アリスロバクター ビスコサス (*Arthrobacter viscosus*) ペニシリン Gアシラーゼ (*Appl. Environ. Microbiol.*, 54, 2603, 1988)、アーケオグロバス フルギダス (*Archaeoglobus fulgidus*) ペニシリンアシラーゼ (*Nature*, 390, 364, 1997)、バチルス メガテリウム (*Bacillus megaterium*) ペニシリン Gアシラーゼ (*FEMS Microbiol. Lett.*, 125, 287, 1995)、シュードモナス (*Pseudomonas*) C427 GL-7ACAアシラーゼ (*J. Ferment. Bioeng.*, 77, 591, 1994)、シュードモナス (*Pseudomonas*) GK16 セファロスポリンアシラーゼ (*J. Bacteriol.*, 163, 1222, 1985)、シュードモナス (*Pseudomonas*) SE83 セファロスポリンアシラーゼ (*J. Bacteriol.*, 169, 5821, 1987) の遺伝子配列と特徴的な相同性を示さない。また、ステノトロフォモナス (*Stenotrophomonas*) 属  $\beta$ -ラクタムアシラーゼに関する DNA 配列ならびにアミノ酸配列に関する報告はない。

#### 【0019】

酵素遺伝子を取得する過程で、ステノトロフォモナス マルトフィリア (*Stenotrophomonas maltophilia*) KNK12 株ゲノムライブラリーから通常のアシラーゼ酵素活性測定スクリーニングも試みたが、活性を示す陽性クローンを得ることはできなかった。これは、ステノトロフォモナス マルトフィリア (*Stenotrophomonas maltophilia*

)  $\beta$ -ラクタムアシラーゼ自身のプロモーターが宿主大腸菌内でRNA転写活性を持たないあるいは弱いので、宿主大腸菌内で酵素が発現しない又は発現が非常に弱いと推測された。

#### 【0020】

##### 【発明の実施の形態】

以下、本発明を詳細に説明する。

ここで述べる遺伝子とは、アミノ酸をコードする領域と、5' 上流および3' 下流でRNAに転写される領域、さらにこの領域外の部分でも転写および翻訳の実行や効率に関わる調節領域を含む領域のことを示す。ステノトロフォモナス マルトフィリア (*Stenotrophomonas maltophilia*) 由来の本発明の遺伝子をステノトロフォモナスマルトフィリアー $\beta$ -ラクタムアシラーゼ (smacy)、smacy遺伝子の発現ポリペプチドをSMACYと略する。

#### 【0021】

本発明の一つの形態によると、ステノトロフォモナス (*Stenotrophomonas*) 属に属する微生物が産生する $\beta$ -ラクタムアシラーゼが提供される。ステノトロフォモナス (*Stenotrophomonas*) 属に属する微生物としては、 $\beta$ -ラクタムアシラーゼを産生する能力がある限り特に限定されないが、例えば、ステノトロフォモナス マルトフィリア (*Stenotrophomonas maltophilia*)、ステノトロフォモナス アシダミニフィラ (*Stenotrophomonas acidaminiphila*)、ステノトロフォモナス アフリカナ (*Stenotrophomonas africana*)、ステノトロフォモナス ニトリトイレダカアンス (*Stenotrophomonas nitritireducans*) 等が挙げられる。

好ましくはステノトロフォモナス マルトフィリア (*Stenotrophomonas maltophilia*) KNK12株が産生する $\beta$ -ラクタムアシラーゼが提供される。

#### 【0022】

さらに、配列番号2で示されるアミノ酸配列と同一又は実質的に同一のアミノ酸配列からなるタンパク質もしくは、配列番号2で示されるアミノ酸配列において、翻訳後修飾され、かつ $\beta$ -ラクタムアシラーゼ活性を有するタンパク質もしくは、配列番号2で示されるアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ $\beta$ -ラクタムアシラーゼ活性を有するタンパク質が提供される。

#### 【0023】

さらに、配列番号2で示されるアミノ酸配列と同一又は実質的に同一のアミノ酸配列からなるタンパク質もしくは、配列番号2で示されるアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ $\beta$ -ラクタムアシラーゼ活性を有するタンパク質をコードするDNAを有する遺伝子が提供される。本発明のDNAであって配列番号1と完全同一の塩基配列を有しないものを、以下では「DNA変異体」とも称する。

#### 【0024】

当該遺伝子は、好ましくはステノトロフォモナス (*Stenotrophomonas*) 属から単離されたものである。より好ましくはステノトロフォモナス マルトフィリア (*Stenotrophomonas maltophilia*) から単離されたものである。

#### 【0025】

ここで、「実質的に同一のアミノ酸配列」とは、活性が性質的に同質なタンパク質をコードしており、配列番号2で示される全アミノ酸配列との相同性の程度が全体で約80%以上、好ましくは約90%以上であるアミノ酸配列を意味する。また、「1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加」とは、部位特異的突然変異誘発法等の周知の方法により欠失、置換もしくは付加できる程度の数のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されることを意味する。

#### 【0026】

つまり、本発明において、DNA変異体は、当該分野において既知の方法によって、配列番号1の塩基配列からなるDNAから調製することができる。このような操作としては、例えば、部位特異的突然変異誘発、点変異、欠失、重複、逆位

、転座、遺伝コードの縮重等により、アミノ酸配列を変えずに塩基配列のみを変更する保存的変更が挙げられる。

さらに、配列番号 2 で示されるアミノ酸配列において、翻訳後修飾され、かつ  $\beta$ -ラクタムアシラーゼ活性を有するタンパク質をコードする DNA を有する遺伝子が提供される。

#### 【0027】

ここで、「翻訳後修飾」とは、mRNA からタンパク質へ翻訳後の部分的なアミノ酸配列の除去や修飾であり、たとえば、微生物のペリプラズム領域へタンパク質が移行する際に必要であるシグナル配列（タンパク質 N 末端部分の約 20 アミノ酸であり疎水性アミノ酸を特徴とする）が酵素的に除去されたものである。

#### 【0028】

$\beta$ -ラクタムアシラーゼ活性とは、アシル基が水によって脱離する場合には加水分解（脱アシル）活性をさし、可逆反応として活性化された側鎖基質から求核物質へのアシル基の転移を触媒する場合には転移活性をさす。なお、加水分解活性の場合は、1 ユニットは 1 分間あたり  $1 \mu\text{mole}$  の D-p-ヒドロキシフェニルグリシンメチルエステル（HPGOMe）の加水分解を触媒する酵素量とし、また、転移活性の場合は、1 ユニットは 1 分間あたり  $1 \mu\text{mole}$  のアモキシシリンを合成する酵素量とし、HPLC 等を用いて定量を行うことができる。

#### 【0029】

さらに、本発明の遺伝子は、配列番号 1 で示される塩基配列において、配列番号 2 で示されるアミノ酸配列をコードする部分に対応する塩基配列が、配列番号 2 で示されるアミノ酸配列と同じアミノ酸配列をコードする DNA からなる遺伝子であってもよい。つまり、配列番号 1 で示される塩基配列は、配列番号 2 で示されるアミノ酸配列と同じアミノ酸配列をコードする DNA を含有するものである。

#### 【0030】

また、本発明は、以下のポリヌクレオチドを提供するものである。配列番号 2 で示されるアミノ酸配列と同一又は実質的に同一のアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする塩基配列からなるポリヌクレオチド、および配列番号 2 で示され

るアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ $\beta$ -ラクタムアシラーゼ活性を有するタンパク質をコードする塩基配列からなるポリヌクレオチド、および配列番号2で示されるアミノ酸配列において、翻訳後修飾され、かつ $\beta$ -ラクタムアシラーゼ活性を有するタンパク質をコードする塩基配列からなるポリヌクレオチド、および配列番号1で示される塩基配列において、配列番号2で示されるアミノ酸配列をコードする部分に対応する塩基配列が、配列番号2で示されるアミノ酸配列と同じアミノ酸配列をコードする塩基配列からなるポリヌクレオチド、配列番号1で示される塩基配列からなるポリヌクレオチド、および、ステノトロフォモナス (*Stenotrophomonas*) 属から単離された上記ポリヌクレオチド。

#### 【0031】

さらに、本発明のタンパク質としては、配列番号2のアミノ酸配列と同一又は実質的に同一のアミノ酸配列からなるタンパク質であってもよいし、また、配列番号2のアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ $\beta$ -ラクタムアシラーゼ活性を有するタンパク質であってもよいし、また、配列番号2で示されるアミノ酸配列において、翻訳後修飾され、かつ $\beta$ -ラクタムアシラーゼ活性を有するタンパク質であってもよい。本発明のタンパク質であって配列番号2と完全同一のアミノ酸配列を有しないものを、以下では「変異タンパク質」とも称する。

#### 【0032】

この際、変異タンパク質としては、上述のようなDNA変異体によってコードされるタンパク質、さらには、基本的な $\beta$ -ラクタムアシラーゼ活性は変化させずにアミノ酸配列が保存的あるいは半保存的に変更（例えば、グリシン、バリン、ロイシン、イソロイシン等の脂肪族鎖を有するアミノ酸同士の置換や、フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン等の芳香族鎖を有するアミノ酸同士の置換）されたタンパク質等が挙げられる。

#### 【0033】

また、本発明は、上述の本発明の遺伝子に含まれる転写調節配列、及び、翻訳調節配列を提供する。当該転写調節配列としては、配列番号1の125番目から1

00塩基上流部分を含む配列である。当該翻訳調節配列としては、配列番号1の125番目から50塩基上流部分を含む配列である。

さらに、本発明は、転写及び／又は翻訳調節領域を含むレギュロンの制御下であり、当該調節配列の一方または両方が、それぞれ同じ又は異なる生物から得られた他の転写及び／又は翻訳調節配列に置き換えられている遺伝子を提供する。

ここで、同じ又は異なる生物から得られた他の転写調節配列及び翻訳調節配列としては、本発明の遺伝子を発現できるものであれば特に制限されることはなく、当該分野において既知のものが使用される。具体的には、大腸菌や放線菌由来の一般的な調節配列等が挙げられる。

#### 【0034】

本発明の別の形態によると、上述の本発明の遺伝子を1以上含む組換えベクターが提供される。また、当該組換えベクターを含む形質転換体も提供される。

この組換えベクターは、本発明の遺伝子を、適当な制限酵素で切断された組換え用ベクター中に連結されることによって調製される。

本発明の組換えベクター作製に用いられる組換え用ベクターとしては、従来公知のものを使用することができ、例えば、転写効率を上げるために例えばlacオペロン、T7RNAポリメラーゼプロモーターなどを挿入遺伝子上流に付与し、選択マーカーとしてカナマイシン耐性遺伝子、テトラサイクリン耐性遺伝子などを持つベクター等が挙げられる。

組換えベクターの調製法としては、当業者に周知の方法を採用することができ、例えば、Molecular Cloning (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)等に記載の方法を適用することができる。

また、形質転換体の作製に用いられる宿主としては、特に制限されないが、例えば、グラム陰性微生物、グラム陽性微生物等が挙げられる。グラム陰性微生物としては、例えば、エシェリヒア (Escherichia) 属、シュードモナス (Pseudomonas) 属等が挙げられ、グラム陽性微生物としては、例えば、バチルス (Bacillus) 属、ストレプトマイセス (Streptomyces) 属が挙げられる。

形質転換体の調製法としては、当業者に周知の方法を採用することができ、例えば、Molecular Cloning (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) 等に記載の方法を適用することができる。

#### 【0035】

さらに本発明は、上述した制御配列に関して操作された、 $\beta$ -ラクタムアシラーゼ遺伝子を含む組換えベクター、および当該組換えベクターを含む形質転換体を提供する。

本発明の別の形態によると、上記形質転換体を培養し、当該形質転換体が産生した $\beta$ -ラクタムアシラーゼを回収することからなる $\beta$ -ラクタムアシラーゼの製造法、つまり、 $\beta$ -ラクタムアシラーゼをコードされた形質転換体、または $\beta$ -ラクタムアシラーゼをコードされた組換えベクターを含む形質転換体を培養し、単離形態の $\beta$ -ラクタムアシラーゼを回収することからなる $\beta$ -ラクタムアシラーゼの製造方法を提供する。

#### 【0036】

また、上記微生物または上記形質転換体を培養し、その菌体、菌体混合培養液、菌体の破砕物、もしくは、菌体から抽出精製された $\beta$ -ラクタムアシラーゼ、を固定化してなる固定化 $\beta$ -ラクタムアシラーゼを提供する。

さらに、上記組換えベクターを調製し、当該組換えベクターで宿主を形質転換し、得られた形質転換体をクローン化し選択することからなる、形質転換体中で $\beta$ -ラクタムアシラーゼを産生する又はその産生を増強する方法を提供する。

#### 【0037】

形質転換体は通常の栄養培地で培養することにより導入した組換えDNAの形質を発現させることができる。組換えDNAに遺伝子DNAまたはベクターDNA由来の性質が付与されている場合は、その性質に合わせて培地に薬剤（例えばカナマイシン、ネオマイシン、クロラムフェニコール、テトラサイクリン等）を補ってもかまわない。

このようにして得られた形質転換体を酵素源として得るには、通常の培地を用いて培養を行えばよいが、必要に応じてIPTG (isopropylthio-

$\beta$ -D-galactoside) 等の添加などの酵素誘導のための処理を行うこともできる。

#### 【0038】

形質転換体の培養のために用いられる培地としては、通常、炭素源（例えば、グルコースやシュクロースのような炭水化物、酢酸のような有機酸、アルコール類等）、窒素源（例えば、アンモニアガス、アンモニア水、アンモニウム塩等）および無機イオン（例えば、リン酸イオン、マグネシウムイオン、カリウムイオン、鉄イオン等）を含有する普通の培地が挙げられる。これに、ビタミン、アミノ酸などの有機微量栄養素を添加すると、好ましい結果が得られる場合が多い。

#### 【0039】

さらに本発明の別の形態によると、前記  $\beta$ -ラクタムアシラーゼ酵素を作用させる様態としては、当該形質転換体の培養液、菌体、菌体処理物、固定化菌体、菌体から抽出した酵素、固定化酵素などを挙げることができる。これらは、大規模なアシル化またはアシル基転換化工程で使用するすることができる。

菌体処理物としては、例えば、粗抽出液、培養菌体凍結乾燥体、アセトン乾燥体、リゾチームで処理した菌体、超音波破碎した菌体が挙げられる。

#### 【0040】

当該酵素含有液からは、公知のタンパク質あるいは酵素等の単離または精製方法により、さらに精製を行うことができる。例えば、硫酸、食塩、硫酸ナトリウム等を添加する塩析沈殿法やアセトン等を添加する有機溶媒沈殿等の手段により沈殿物として本酵素を回収することができる。また、イオン交換クロマトグラフィー、吸着クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィー等の手段を組み合わせることにより精製することができる。

#### 【0041】

このようにして得られた当該  $\beta$ -ラクタムアシラーゼはフェニル酢酸、フェノキシ酢酸、アモキシシリンによる酵素阻害をほとんど示さないという特徴的な性質を持つ。

さらに、これら菌体、菌体処理物、無細胞酵素抽出物、精製酵素は、公知の手段で固定化することができる。固定化は当業者に周知の方法である架橋法、共有結

合法、物理的吸着法、包括法などで行うことができる。なお、固定化法については、例えば WO 96/20275 に示される方法が参考になる。

#### 【0042】

固定化に使用される支持体としては、Duolite A568 または DS17186 (ローム・アンド・ハース社:登録商標) などのフェノールホルムアルデヒド陰イオン交換樹脂、Amberlite IRA935、IRA945、IRA901 (ローム・アンド・ハース社:登録商標)、Lewatit OC1037 (バイエル社:登録商標)、Diaion EX-05 (三菱化学:登録商標) などのポリスチレン樹脂のような各種アミンやアンモニウム塩あるいはジエタノールアミン型の官能基を持つ各種陰イオン交換樹脂が適している。その他、DEAE-セルロースなどの支持体も使用することができる。

#### 【0043】

さらに、酵素の吸着をより強固かつ安定にするため、通常、架橋剤を用いるが、好適な例として、グルタルアルデヒドを挙げることができる。使用する酵素は、精製酵素だけでなく、菌体、菌体処理物、無細胞酵素抽出物など種々の精製度のものが使用できる。固定化菌体あるいは固定化酵素の調製は、菌体液あるいは酵素液を支持体を加えて攪拌して吸着させた後、架橋処理をする等の通常の調製法が使用できる。

#### 【0044】

$\beta$ -ラクタム系抗生物質は、 $\beta$ -ラクタム母核基質と側鎖基質を水や緩衝液などの媒質中で当該酵素と接触させる方法により合成することができる。この際用いる側鎖基質としては、エステル化合物およびその塩酸塩やアミド体を用いることができる。 $\beta$ -ラクタム系抗生物質がアモキシシリンである場合には、 $\beta$ -ラクタム母核基質が 6-アミノペニシラン酸 (6-APA) であり、側鎖基質がヒドロキシフェニルグリシンメチルエステル (HPGOMe) 等である。

すなわち、当該反応は、通常、菌体、菌体処理物、無細胞酵素抽出物、精製酵素またはそれらの固定化物を、基質を含む媒質中に溶解あるいは懸濁させ、または通過させることにより行うことができる。この反応は、例えば 20~40℃で 30 分から 8 時間程度反応させることによって行うことができる。

## 【0045】

## 【実施例】

以下の実施例により、本発明をさらに説明する。つまり、本発明の遺伝子、タンパク質、組換えベクター、形質転換体、 $\beta$ -ラクタム系抗生物質の生産等の実施態様を以下に説明するが、本発明は下記実施態様に制限されるものではない。

## 【0046】

材料及び方法 $\beta$ -ラクタムアシラーゼ遺伝子のクローニング

全体的な遺伝子操作およびクローニング法は、Molecular Cloning (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) に記載されているように行った。DNA操作に使用した酵素、プラスミド及びイーコリ (E. coli) クローニング宿主は、市場の供給者から購入しその説明に従い使用した。

## 【0047】

培地

## B培地

ペプトン 5 g/l、イーストエキストラクト 5 g/l、 $K_2HPO_4$  2 g/l、シュクロース 20 g/l、 $MgCl_2 \cdot 6H_2O$  1 g/l、グルタミン酸ナトリウム 2 g/l、 $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  0.1 g/l、pH 7.2

## LB培地

バクトトリプトン 10 g/l、イーストエキストラクト 5 g/l、NaCl 5 g/l、pH 7.0

## 【0048】

緩衝液

1×SSC 0.15M NaCl、0.015M sodium citrate

30mM KPB (pH 6.0) 30mM  $KH_2PO_4$ 、KOHでpH 6.0に調整

50mM KPB (pH 5.0) 50mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、KOHでpH 5.0  
に調整

#### 【0049】

##### 菌株

ステノトロフォモナス マルトフィリア (*Stenotrophomonas maltophilia*) KNK12株を、ステノトロフォモナス マルトフィリア (*Stenotrophomonas maltophilia*)  $\beta$ -ラクタムアシラーゼ遺伝子の供与株として使用した。

イーコリ (*E. coli*) DH5 $\alpha$ 株、イーコリ (*E. coli*) HB101株を組換えプラスミドの宿主として使用した。

#### 【0050】

##### $\beta$ -ラクタムアシラーゼ活性

$\beta$ -ラクタムアシラーゼの活性とは、アシル基が水によって脱離する場合には加水分解 (脱アシル) 活性をさし、可逆反応として活性化された側鎖基質から求核物質へのアシル基の転移を触媒する場合には転移活性をさす。

加水分解活性の場合、1ユニットは1分間あたり1  $\mu\text{mole}$  のD-p-ヒドロキシフェニルグリシンメチルエステル (HPGOMe) の加水分解を触媒する酵素量とする。

転移活性の場合、1ユニットは1分間あたり1  $\mu\text{mole}$  のアモキシシリンを合成する酵素量とする。

それぞれの反応条件は以下に示し、定量はHPLCにより行った。

#### 【0051】

##### ヒドロキシフェニルグリシンメチルエステル (HPGOMe) 加水分解反応

HPGOMe  $\cdot$  HClを30mM KPB (pH 8.0) に0.5%になるように溶かして基質液とした。菌体あるいは粗酵素液を基質液に懸濁し、30℃で4時間振とうしながら反応させた。1N HClを基質液の1/20量加えて反応を停止させた。

#### 【0052】

##### アモキシシリン合成活性反応

6-アミノペニシラン酸(6-APA)、HPGOMe・HClD-p-ヒドロキシフェニルグリシンメチルエステルを30mM KPB (pH6.0)に0.5%になるように溶かして基質液とした。菌体あるいは粗酵素液を基質液に懸濁し、30℃で4時間振とうしながら反応させた。1N HClを基質液の1/20量加えて反応を停止させた。

#### 【0053】

##### 薄層クロマトグラフィー(TLC)を用いたアモキシシリンの検出

菌体反応、粗酵素反応における、アモキシシリンの検出を薄層クロマトグラフィーで行った。反応液を遠心して上清を回収してシリカゲル薄層プレートに微量スポットし、酢酸エチル：酢酸：水=60：20：20の展開溶媒にて展開させ、溶媒除去後ニンヒドリン反応にてアモキシシリンを検出した。

#### 【0054】

##### 高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を用いたアモキシシリンの検出

反応液を遠心して上清を回収し、移動相で10倍希釈してHPLCで測定した。分析条件は、カラムはコスモシル5C18 AR (ナカライテスク社)を用い、移動相は1%アセトニトリル/50mM KPB (pH5.0)、流速1.0ml/min、カラム温度35℃、測定波長225nmで行った。ピークは標準品を用いて同定し、アモキシシリンの標準品として、アモキシシリン三水和物(和光純薬)を用いた。保持時間は、HPG 1.8min、6-APA 5.9min、アモキシシリン 7.5min、HPGOMe・HCl 9.4minであった。

#### 【0055】

(実施例1) ステノトロフォモナス マルトフィリア (*Stenotrophomonas maltophilia*) KNK12株のβ-ラクタムアシラーゼの精製

KNK12株をB培地を用いて30℃で増殖させた。以下の操作は、4℃で行った。細胞を遠心分離により回収し、0.1M Tris・HCl (pH8.0)に懸濁し、EDTA・2Naを4.7g/l、リゾチームを0.13g/lになるよう添加し、一晚攪拌した。MgSO<sub>4</sub>・7H<sub>2</sub>Oを3.13g/l、bov

ine pancreatic deoxribonuclease Iを0.06mg/lになるように添加して一晩反応させ、菌体を超音波破碎し、上清を遠心分離で回収した。Ca(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>Oを22.9g/l、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>を22.9g/lになるよう添加し、上清を遠心分離で回収した。透析後、陽イオン交換ゲルクロマトグラフ(CMセファロースCL-6B)を3回、ゲル濾過クロマトグラフ(セファクリル-300)を1回用いて精製を行った(Agric. Biol. Chem., 44(5), 1069, 1980)。カラムから溶出された画分はTLCによりアモキシシリン合成活性を確認し、次の精製段階へ進めた。得られたSMACYタンパク質は、SDS-PAGEにより約70kDaの分子量を示した。

#### 【0056】

(実施例2) ステノトロフォモナス マルトフィリア(Stenotrophomonas maltophilia) KNK12株のβ-ラクタムアシラーゼのアミノ酸配列の決定

上記(実施例1)の精製法で得られたSMACYタンパク質を、リジルエンドペプチダーゼにより限定分解し、ペプチド断片のアミノ酸配列を決定した。SMACYタンパク質をバッファー(10mM Tris·HCl(pH9.0)、4M Urea)に懸濁してリジルエンドペプチダーゼをSMACYタンパク質の1/50量になるよう添加し、37℃で6時間反応させた。逆相カラム(YMC-Pack PROTEIN-RP(ワイエムシ社))にてペプチドを分取し、Model 49Xプロテインシーケンサー(アプライド・バイオシステム社)で解析を行った。得られたアミノ酸配列を、配列番号3に示した。

#### 【0057】

(実施例3) ステノトロフォモナス マルトフィリア(Stenotrophomonas maltophilia) KNK12株のβ-ラクタムアシラーゼ遺伝子のクローニング

ステノトロフォモナス マルトフィリア(Stenotrophomonas maltophilia) KNK12株のゲノムDNAを単離してNcoIで消化した6-8kbpのフラクションを、NcoIおよびアルカリフォスファター

ゼ (C I A P) 処理した p S L 3 0 1 プラスミド (インビトロジェン社) にクローニングしたものを、イーコリ (E. coli) H B 1 0 1 株に形質転換し、L - A m p プレート (L B 培地にバクトアガー 1 5 g / l、アンピシリン 5 0 m g / l になるよう添加したもの) にまき、3 7 ° C で一晩培養した。このプレートのコロニーをナイロンメンブレンにレプリカし、コロニーが適当な大きさになるまで培養した後、菌体を溶菌してフィルターを作成した。配列番号 3 に含まれるアミノ酸配列で、配列番号 5 で示されるアミノ酸配列をコードする配列番号 4 に示される K 1 オリゴヌクレオチドをプローブとして用い、コロニーハイブリダイゼーションを行った。Gene Images 3' - o l i g o l a b e l l i n g (アマシャム ファルマシア バイオテック社) で K 1 オリゴヌクレオチドの 3' 末端を蛍光ラベルし、5 0 ° C のハイブリダイゼーションバッファー (5 × S S C、0. 1 % s o d i u m d o d e c y l s u l f a t e、2 0 倍希釈 l i q u i d b l o c k (アマシャム ファルマシア バイオテック社)、0. 5 % d e x t r a n s u l p h a t e) 中で一晩ハイブリダイズさせた。室温の 5 × S S C 溶液 (0. 1 % s o d i u m d o d e c y l s u l f a t e)、次いで 4 2 ° C の 1 × S S C 溶液 (0. 1 % s o d i u m d o d e c y l s u l f a t e) 中でメンブレンを洗浄し、Gene Images C D P - S t a r d e t e c t i o n m o d u l e (アマシャム ファルマシア バイオテック社) で検出を行い、陽性クローンを得た。このクローンより得られたプラスミドを p S L K N K 2 7 とした。この p S L K N K 2 7 には約 6. 3 k b p のゲノム断片が挿入されていた。

#### 【0058】

(実施例 4)  $\beta$ -ラクタムアシラーゼ遺伝子の配列決定

上記で得られた陽性クローンの配列を、BigDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit (アプライド・バイオシステム社) を用いたデオキシ配列決定によりシーケンシング反応を行い、ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (アプライド・バイオシステム社) で解析を行った。得られた  $\beta$ -ラクタムアシラーゼ遺伝子配列を配列番号 1 に、予測されたアミノ酸配列を配列番号

2に示した。

#### 【0059】

(実施例5)  $\beta$ -ラクタムアシラーゼ遺伝子の発現ベクターの構築

pUC19プラスミドのlac Z遺伝子の開始コドン部位にNde Iサイトを作製するプライマーを作製してポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を行い、pUC19プラスミドにNde Iサイトを1カ所加えたpUCNdeプラスミドを作製した。pTrc99A(アマシャム ファルマシア バイオテック社)プラスミドも同様にPCRを行い、Nco IサイトをNde Iサイトに変えたpTrcNdeプラスミドを作製した。pUCNdeプラスミドをNde I、Ssp Iで切断した2.0kbp断片と、pTrcNdeプラスミドをNde I、Ssp Iで切断した0.6kbp断片をライゲーションして、pUCNTプラスミドを作製した(Journal of Bioscience and Bioengineering, 87, 149, 1999、WO94/03613)。

pUCNTプラスミドをCrf10 I、Ssp Iで切断した1.8kbpの断片と、pKC7プラスミド(Gene, 7, 79, 1979)をテンプレートとしてカナマイシン耐性遺伝子をCrf10 I、Ssp Iサイトを持つようにPCRで1.2kbpの断片を作製し、ライゲーションしてpUCNTkmTn5(kam<sup>r</sup>)プラスミドを作製した。

次に、pSLKNK27をテンプレートとし、K-Nde I-4プライマー(配列番号6: GGAATTCCATATGCATGTGCGTGCCGTAGC)とK-BamH I-1プライマー(配列番号7: CGCGGATCCTCAGTACACCGGCAGGTC)を用いてPCRを行ってCDS断片を増幅した。このCDS断片をpUCNTkmTn5(kam<sup>r</sup>)プラスミドベクターのNde IサイトとBamH Iサイトにクローニングし、pUCNTkmTn5-KNK-Lとした。この発現ベクターの構築図を図1に示した。

#### 【0060】

(実施例6)  $\beta$ -ラクタムアシラーゼ遺伝子の発現

pUCNTkmTn5-KNK-LプラスミドをE. coli HB101に形

質転換した株 (pUCNTkmTn5-KNK-L/HB101) を LB 培地にカナマイシンを 50 mg/l になるよう添加したものにまき、30℃で一晩培養した。菌体を遠心分離で回収し、30 mM KPB に懸濁した後、超音波破碎して上清を遠心分離で回収し、SDS-PAGE を行ったところ、約 70 kDa のバンドが確認され、 $\beta$ -ラクタムアシラーゼが発現されていることが確認された。

#### 【0061】

(実施例 7)  $\beta$ -ラクタムアシラーゼ活性の確認

pUCNTkmTn5-KNK-L/HB101 株を (実施例 6) と同様に一晩培養後、1 mM になるように IPTG を添加してさらに 3 時間培養した。菌体を Lysozyme 0.44 mg/ml で 15 分間氷上で処理し、超音波破碎遠心した上清を粗酵素液とした。粗酵素液の総タンパク質量はブラッドフォード法にて定量した。基質 (0.5% HPGOMe · HCl, 0.5% 6-APA) 200  $\mu$ l に 25  $\mu$ g のタンパク質を添加し、30℃で 1 時間振とうしながら反応させ、10 倍に希釈して 10  $\mu$ l を HPLC で分析し、アモキシシリンのピークを検出した。これにより、pUCNTkmTn5 プラスミドにクローニングされたステノトロフォモナス マルトフィリア (*Stenotrophomonas maltophilia*) KNK12 株  $\beta$ -ラクタムアシラーゼ遺伝子が大腸菌 HB101 株で発現され、活性を持つことが確認された。

#### 【0062】

(実施例 8)  $\beta$ -ラクタムアシラーゼの精製

pUCNTkmTn5-KNK-L/HB101 株を (実施例 1) のように培養し、細胞破碎した後、上清を遠心分離で回収した。この上清を 0.45  $\mu$ m フィルターで濾過し、AKTA explorer 10S システム (アマシャムファルマシア バイオテック社) を用い、陽イオン交換ゲルクロマトグラフを行った。カラムから溶出された画分は TLC によりアモキシシリン合成活性を確認した。アモキシシリン合成活性を示した画分を SDS-PAGE を行ったところ、 $\beta$ -ラクタムアシラーゼがフラクションの総タンパク質の 10% 以上を占めるまで精製が進んでいることが確認できたので、このフラクションを用いて以下の諸

性質を調べた。

#### 【0063】

(試験例1) アモキシシリン合成活性の比較

ステノトロフォモナス マルトフィリア (*Stenotrophomonas maltophilia*) KNK12株由来 $\beta$ -ラクタムアシラーゼと既知の *E. coli* PenG amidase (sigma社) のアモキシシリン合成活性を比較した。酵素液として、ステノトロフォモナス マルトフィリア (*Stenotrophomonas maltophilia*) KNK12株由来 $\beta$ -ラクタムアシラーゼは(実施例8)で得られたフラクション(酵素濃度 約3.2 ng/10  $\mu$ l)、*E. coli* PenG amidaseは100倍希釈液(10.2 munit/10  $\mu$ l、酵素濃度 約3.5 ng/10  $\mu$ l)を用いた。

#### 【0064】

6-APA及びHPGOMe $\cdot$ HClD-p-ヒドロキシフェニルグリシンメチルエステルを30mM KPB (pH6.0)に0.5%になるように溶かした基質液200  $\mu$ lに、酵素液10  $\mu$ lを加え、30℃で振とうしながら反応させた。反応開始から0、5、10、15、30、45、60、75、90、105、120分間後に1N HClを基質液の1/20量加えて反応を停止させた。生成したアモキシシリンの検出はHPLCを用いて行った。その結果を図2に示す。この結果から、ステノトロフォモナス マルトフィリアKNK12株由来 $\beta$ -ラクタムアシラーゼは、*E. coli* PenG amidaseと比較して、非常に高い変換率でアモキシシリンを合成することがわかった。

#### 【0065】

(試験例2) フェニル酢酸(PAA)とフェノキシ酢酸(PXA)による合成活性阻害の比較

6-APA及びHPGOMe $\cdot$ HClD-p-ヒドロキシフェニルグリシンメチルエステルを30mM KPB (pH6.0)に0.5%になるように溶かした基質液200  $\mu$ lに、(試験例1)の酵素液10  $\mu$ lを加えた。PAAは0.3%、PXAは0.35%になるように加え、30℃で振とうしながら1時間反応させ

、1N HClを基質液の1/20量加えて反応を停止させた。生成したアモキシシリンの検出はHPLCを用いて行った。それぞれの酵素において、基質のみで反応させた時のアモキシシリン合成量を100%とする、相対活性を表した結果を表1に示す。

【0066】

【表1】

	KNK12株由来 $\beta$ -ラクタムアシラーゼ	E. coli PenG amidase
基質	100%	100%
基質 + 0.3%PAA	107%	0%
基質 + 0.35%PXA	76%	0%

【0067】

この結果から、E. coli PenG amidaseはフェニル酢酸又はフェノキシ酢酸によってアモキシシリンの合成が阻害されるが、ステノトロフォモナス マルトフィリアKNK12株由来 $\beta$ -ラクタムアシラーゼは、まったく阻害されないか、又は、阻害されたとしてもわずかであることがわかった。

【0068】

(試験例3) アモキシシリンの分解活性

アモキシシリンを30mM KPB (pH6.0)に0.5%になるように溶かした液200 $\mu$ lに、(試験例1)の酵素液10 $\mu$ lを加え、30℃で振とうしながら1時間反応させ、1N HClを基質液の1/20量加えて反応を停止させた。残存したアモキシシリンの検出はHPLCを用いて行った。その結果を図3に示す。

この結果から、E. coli PenG amidaseがアモキシシリンを非常に素早く分解するのに対して、ステノトロフォモナス マルトフィリアKNK12株由来 $\beta$ -ラクタムアシラーゼはアモキシシリンの分解速度が遅いことがわかった。

【0069】

(試験例4) HPGOMeの分解活性の比較

HPGOMe・HClを30mM KPB (pH6.0)に0.5%になるように溶かした液200 $\mu$ lに、(試験例1)の酵素液10 $\mu$ lを加え、30℃で振とうしながら1時間反応させ、1N HClを基質液の1/20量加えて反応を停止させた。残存したHPGOMeの検出はHPLCを用いて行った。その結果を図4に示す。

この結果から、ステノトロフォモナス マルトフィリアKNK12株由来 $\beta$ -ラクタムアシラーゼは、E. coli PenG amidaseに対して、HPGOMeの分解速度が速いことがわかった。

#### 【0070】

##### 【発明の効果】

ステノトロフォモナス (Stenotrophomonas) 属 $\beta$ -ラクタムアシラーゼ遺伝子を発現ベクターに結合して宿主中で発現させることにより、効率よく $\beta$ -ラクタムアシラーゼを調製することができる。この $\beta$ -ラクタムアシラーゼを利用して、大量の脱アシル化／アシル基転換化の工程に使用することができる。たとえば、アモキシシリンの酵素的生産法に利用することができる。

#### 【0071】

##### 【配列表】

##### SEQUENCE LISTING

<110> KANEKA CORORATION

<120> Novel acylase gene

<130> TKS-4797

<160> 7

<210> 1

<211> 2529

<212> DNA

<213> *Stenotrophomonas maltophilia*

<220>

<221> CDS

<222> (126)..(2036)

<400> 1

tctacaacgg cttggcacat gtgccatcag tcctaccccc aaagagcgca gaacgcaaag 60

cctgcacaca cttcaccgcg cggggcagga gtacgcttgg gactttcctg cccgaggggt 120

cgccc atg cat gtg cgt gcc gta gca gtt gcc atc gcc ctg agc ctg tcc 170

Met His Val Arg Ala Val Ala Val Ala Ile Ala Leu Ser Leu Ser

1

5

10

15

agc acc gtg ctg gcc gcc gac acc ccg ccg atg acc ccg gac atc agc 218

Ser Thr Val Leu Ala Ala Asp Thr Pro Pro Met Thr Pro Asp Ile Ser

20

25

30

ggc aag cct ttc att gcg ccc gat gtc ggc cgc gac tac gac aag cgc 266

Gly Lys Pro Phe Ile Ala Pro Asp Val Gly Arg Asp Tyr Asp Lys Arg

35

40

45

gtg gtg atg gtg ccg atg cgc gac ggt acc agg ctg tac acg gtg atc 314

Val Val Met Val Pro Met Arg Asp Gly Thr Arg Leu Tyr Thr Val Ile

50

55

60

gtg gtg ccc aag ggc gcg cac aat gcc ccg atc ctg ctg acc cgc acg 362

Val Val Pro Lys Gly Ala His Asn Ala Pro Ile Leu Leu Thr Arg Thr  
65 70 75

ccc tac gat gct gcc ggc cgc gcc agc cgc agc gat tcg ccg cgc atg 410  
Pro Tyr Asp Ala Ala Gly Arg Ala Ser Arg Ser Asp Ser Pro Arg Met  
80 85 90 95

cgc gac ctg ctg ccg cag ggg gat gaa gtc ttc gtc gat ggc ggc tat 458  
Arg Asp Leu Leu Pro Gln Gly Asp Glu Val Phe Val Asp Gly Gly Tyr  
100 105 110

atc cgc gtg ttc cag gac atc cgg ggc aag tac ggt tcg gaa ggc gat 506  
Ile Arg Val Phe Gln Asp Ile Arg Gly Lys Tyr Gly Ser Glu Gly Asp  
115 120 125

tat gtg atg acc cgg ccg ctg cgc ggg ccg ttg aac aac acc aag gtc 554  
Tyr Val Met Thr Arg Pro Leu Arg Gly Pro Leu Asn Asn Thr Lys Val  
130 135 140

gac cac tcc acc gat gca tgg gac acc atc gac tgg ttg gtg aaa cac 602  
Asp His Ser Thr Asp Ala Trp Asp Thr Ile Asp Trp Leu Val Lys His  
145 150 155

gtg ccg gaa agc aac ggc aag gtc ggc atg ctg ggc tcg tcg tac gaa 650  
Val Pro Glu Ser Asn Gly Lys Val Gly Met Leu Gly Ser Ser Tyr Glu  
160 165 170 175

ggc ttc acc gtg gtg atg gcc ctg acc gac ccg cat ccg gcg ctg aag 698  
Gly Phe Thr Val Val Met Ala Leu Thr Asp Pro His Pro Ala Leu Lys

180

185

190

gtg gcc gcc ccg cag agc ccg atg gtc gat ggc tgg atg ggc gac gac 746

Val Ala Ala Pro Gln Ser Pro Met Val Asp Gly Trp Met Gly Asp Asp

195

200

205

tgg ctc aac tac ggg gcc ttc cgc cag gtc aat ttc aac tac ttc gca 794

Trp Leu Asn Tyr Gly Ala Phe Arg Gln Val Asn Phe Asn Tyr Phe Ala

210

215

220

atg cag acc gag aag cgc ggc aag ggc acg ccg ctg ccc agc ctg ggc 842

Met Gln Thr Glu Lys Arg Gly Lys Gly Thr Pro Leu Pro Ser Leu Gly

225

230

235

tac gac gac tac agc acc ttc ctg cgc atc ggt tcg gcc ggt gac tac 890

Tyr Asp Asp Tyr Ser Thr Phe Leu Arg Ile Gly Ser Ala Gly Asp Tyr

240

245

250

255

gca cgc ttc acc ggc gtg gac cag ctg acc tgg tgg aag aag ctg gtg 938

Ala Arg Phe Thr Gly Val Asp Gln Leu Thr Trp Trp Lys Lys Leu Val

260

265

270

cag cac ccg gcc tac gat ggc ttc tgg cag ggc cag gcg ctg gat gcg 986

Gln His Pro Ala Tyr Asp Gly Phe Trp Gln Gly Gln Ala Leu Asp Ala

275

280

285

gtg atg gcg aag acc ccg ctg aag gtg ccg acc atg tgg ctg cag ggc 1034

Val Met Ala Lys Thr Pro Leu Lys Val Pro Thr Met Trp Leu Gln Gly

290

295

300

ctg tgg gac cag gaa gac atg tgg ggc gcc aac cat gcc tac cag gcg 1082

Leu Trp Asp Gln Glu Asp Met Trp Gly Ala Asn His Ala Tyr Gln Ala

305

310

315

atg gaa ggc cgc gac acc ggc aat acc cac aat tac ctg gtg atg ggc 1130

Met Glu Gly Arg Asp Thr Gly Asn Thr His Asn Tyr Leu Val Met Gly

320

325

330

335

ccg tgg cgg cac agc cag gtg aac tac acc ggc aac gag ctg ggt gcg 1178

Pro Trp Arg His Ser Gln Val Asn Tyr Thr Gly Asn Glu Leu Gly Ala

340

345

350

ctg aag ttc gag ggc gat acc gcg ctg cag ttc cgc cgc gat gtg ctc 1226

Leu Lys Phe Glu Gly Asp Thr Ala Leu Gln Phe Arg Arg Asp Val Leu

355

360

365

aag ccg ttc ttc gac cag tac ctg gtg gat ggc gca ccg aag gcc gac 1274

Lys Pro Phe Phe Asp Gln Tyr Leu Val Asp Gly Ala Pro Lys Ala Asp

370

375

380

acg ccg ccg gtg ctc atc tac aac acc ggc gaa aac cac tgg gat cgc 1322

Thr Pro Pro Val Leu Ile Tyr Asn Thr Gly Glu Asn His Trp Asp Arg

385

390

395

ctg cag ggc tgg ccg cgc agt tgc gac aag ggc tgc acg gcg gcc agc 1370

Leu Gln Gly Trp Pro Arg Ser Cys Asp Lys Gly Cys Thr Ala Ala Ser

400

405

410

415

aag ccg ctg tac ctg cgt gcc ggt ggc aag ctg gcc ttc cag gca ccg 1418  
Lys Pro Leu Tyr Leu Arg Ala Gly Gly Lys Leu Ala Phe Gln Ala Pro

420

425

430

gcg gcg ggt gaa ggt gat ttc gag gaa tac gtg tcc gac ccg gcc aag 1466  
Ala Ala Gly Glu Gly Asp Phe Glu Glu Tyr Val Ser Asp Pro Ala Lys

435

440

445

ccg gtg ccg ttc gtg ccg cgc ccg gtg cgt ttt ggc gac cgt gac atg 1514  
Pro Val Pro Phe Val Pro Arg Pro Val Arg Phe Gly Asp Arg Asp Met

450

455

460

tgg acc acg tgg ctg gtg aag gac caa cgt ttt gtc gat ggt cgt ccg 1562  
Trp Thr Thr Trp Leu Val Lys Asp Gln Arg Phe Val Asp Gly Arg Pro

465

470

475

gat gtg ctg acc ttc atc acc gaa ccg ctg gcc gag ccg ctg cgg atc 1610  
Asp Val Leu Thr Phe Ile Thr Glu Pro Leu Ala Glu Pro Leu Arg Ile

480

485

490

495

ggc ggc gcg ccg gtg gtg cat ctg cag gcg tcc acc agt ggc acc gac 1658  
Gly Gly Ala Pro Val Val His Leu Gln Ala Ser Thr Ser Gly Thr Asp

500

505

510

agc gac tgg gtg gtg aag ctg atc gac gtc tac ccg gat cag gaa gcg 1706  
Ser Asp Trp Val Val Lys Leu Ile Asp Val Tyr Pro Asp Gln Glu Ala

515

520

525

tca acg ccg gaa atg ggt ggc tat gag ctg ccg gtg tcg ctg gcg atc 1754

Ser Thr Pro Glu Met Gly Gly Tyr Glu Leu Pro Val Ser Leu Ala Ile  
530 535 540

ttc cgt ggg cgc tat cgg gag agt ttc agc gac ccg aag ccg ctg gca 1802  
Phe Arg Gly Arg Tyr Arg Glu Ser Phe Ser Asp Pro Lys Pro Leu Ala  
545 550 555

gcg aac cag gtg ctg ccg tac cgc ttt gat ctg ccc aat gcc aac cat 1850  
Ala Asn Gln Val Leu Pro Tyr Arg Phe Asp Leu Pro Asn Ala Asn His  
560 565 570 575

gtg ttc cag aag ggg cac cgg gtg atg gtg cag gtg cag tcc agc ctg 1898  
Val Phe Gln Lys Gly His Arg Val Met Val Gln Val Gln Ser Ser Leu  
580 585 590

ttc ccg ctg tat gac cgc aac ccg cag acc tac gtg ccg aac atc tac 1946  
Phe Pro Leu Tyr Asp Arg Asn Pro Gln Thr Tyr Val Pro Asn Ile Tyr  
595 600 605

ctg gcc aag ccg ggc gat tac cag aag gcc acg cag cgg gtg tgg cac 1994  
Leu Ala Lys Pro Gly Asp Tyr Gln Lys Ala Thr Gln Arg Val Trp His  
610 615 620

agc gcc gcg cag gcg agc tac gtc gac ctg ccg gtg tac tga 2036  
Ser Ala Ala Gln Ala Ser Tyr Val Asp Leu Pro Val Tyr  
625 630 635

ggcggagaat ggctgtgtag tgccggccgc tggccggcaa cgcggagcgg tagcgccggg 2096

ccatgcccgg cggatggggt agtgccggcc gctggccggc aacgcggtga agccggcgcg 2156  
tgtcgaccaa ggccgacacc tgccagagca cgtcagccta ctttcgaggg accggtgcgc 2216  
cagcggctgg gaaccagacc gaagcgcttg cggaaggcgg cggcgaagtt gctggggtgg 2276  
cggtagccgg tggcgctccgc cgcctgttca acgctccagc cgtgttcgcg caggccgcgt 2336  
tcggcggtgt gcatgcgttg ttcgtgcagg tagtcgaaca ccgagcaccc gtattgctgc 2396  
acgaagtggc ggccgacgca gctgggactc atgcaggcca gctgggccag ttccaccagg 2456  
ctgtgggcgt ggctgggatc gtcgtgcagg aagccccgca cgcgttcaat cgggccaaagt 2516  
tggccgcgcc aaa 2529

<210> 2

<211> 636

<212> PRT

<213> Stenotrophomonas maltophilia

<400> 2

Met His Val Arg Ala Val Ala Val Ala Ile Ala Leu Ser Leu Ser Ser

1 5 10 15

Thr Val Leu Ala Ala Asp Thr Pro Pro Met Thr Pro Asp Ile Ser Gly

20 25 30

Lys Pro Phe Ile Ala Pro Asp Val Gly Arg Asp Tyr Asp Lys Arg Val

35 40 45

Val Met Val Pro Met Arg Asp Gly Thr Arg Leu Tyr Thr Val Ile Val  
50 55 60

Val Pro Lys Gly Ala His Asn Ala Pro Ile. Leu Leu Thr Arg Thr Pro  
65 70 75 80

Tyr Asp Ala Ala Gly Arg Ala Ser Arg Ser Asp Ser Pro Arg Met Arg  
85 90 95

Asp Leu Leu Pro Gln Gly Asp Glu Val Phe Val Asp Gly Gly Tyr Ile  
100 105 110

Arg Val Phe Gln Asp Ile Arg Gly Lys Tyr Gly Ser Glu Gly Asp Tyr  
115 120 125

Val Met Thr Arg Pro Leu Arg Gly Pro Leu Asn Asn Thr Lys Val Asp  
130 135 140

His Ser Thr Asp Ala Trp Asp Thr Ile Asp Trp Leu Val Lys His Val  
145 150 155 160

Pro Glu Ser Asn Gly Lys Val Gly Met Leu Gly Ser Ser Tyr Glu Gly  
165 170 175

Phe Thr Val Val Met Ala Leu Thr Asp Pro His Pro Ala Leu Lys Val  
180 185 190

Ala Ala Pro Gln Ser Pro Met Val Asp Gly Trp Met Gly Asp Asp Trp  
195 200 205

Leu Asn Tyr Gly Ala Phe Arg Gln Val Asn Phe Asn Tyr Phe Ala Met  
210 215 220

Gln Thr Glu Lys Arg Gly Lys Gly Thr Pro Leu Pro Ser Leu Gly Tyr  
225 230 235 240

Asp Asp Tyr Ser Thr Phe Leu Arg Ile Gly Ser Ala Gly Asp Tyr Ala  
245 250 255

Arg Phe Thr Gly Val Asp Gln Leu Thr Trp Trp Lys Lys Leu Val Gln  
260 265 270

His Pro Ala Tyr Asp Gly Phe Trp Gln Gly Gln Ala Leu Asp Ala Val

275	280	285
Met Ala Lys Thr Pro Leu Lys Val Pro Thr Met Trp Leu Gln Gly Leu		
290	295	300
Trp Asp Gln Glu Asp Met Trp Gly Ala Asn His Ala Tyr Gln Ala Met		
305	310	315
Glu Gly Arg Asp Thr Gly Asn Thr His Asn Tyr Leu Val Met Gly Pro		
325	330	335
Trp Arg His Ser Gln Val Asn Tyr Thr Gly Asn Glu Leu Gly Ala Leu		
340	345	350
Lys Phe Glu Gly Asp Thr Ala Leu Gln Phe Arg Arg Asp Val Leu Lys		
355	360	365
Pro Phe Phe Asp Gln Tyr Leu Val Asp Gly Ala Pro Lys Ala Asp Thr		
370	375	380
Pro Pro Val Leu Ile Tyr Asn Thr Gly Glu Asn His Trp Asp Arg Leu		
385	390	395
Gln Gly Trp Pro Arg Ser Cys Asp Lys Gly Cys Thr Ala Ala Ser Lys		
405	410	415
Pro Leu Tyr Leu Arg Ala Gly Gly Lys Leu Ala Phe Gln Ala Pro Ala		
420	425	430
Ala Gly Glu Gly Asp Phe Glu Glu Tyr Val Ser Asp Pro Ala Lys Pro		
435	440	445
Val Pro Phe Val Pro Arg Pro Val Arg Phe Gly Asp Arg Asp Met Trp		
450	455	460
Thr Thr Trp Leu Val Lys Asp Gln Arg Phe Val Asp Gly Arg Pro Asp		
465	470	475
Val Leu Thr Phe Ile Thr Glu Pro Leu Ala Glu Pro Leu Arg Ile Gly		
485	490	495
Gly Ala Pro Val Val His Leu Gln Ala Ser Thr Ser Gly Thr Asp Ser		
500	505	510

Asp Trp Val Val Lys Leu Ile Asp Val Tyr Pro Asp Gln Glu Ala Ser			
515	520	525	
Thr Pro Glu Met Gly Gly Tyr Glu Leu Pro Val Ser Leu Ala Ile Phe			
530	535	540	
Arg Gly Arg Tyr Arg Glu Ser Phe Ser Asp Pro Lys Pro Leu Ala Ala			
545	550	555	560
Asn Gln Val Leu Pro Tyr Arg Phe Asp Leu Pro Asn Ala Asn His Val			
565	570	575	
Phe Gln Lys Gly His Arg Val Met Val Gln Val Gln Ser Ser Leu Phe			
580	585	590	
Pro Leu Tyr Asp Arg Asn Pro Gln Thr Tyr Val Pro Asn Ile Tyr Leu			
595	600	605	
Ala Lys Pro Gly Asp Tyr Gln Lys Ala Thr Gln Arg Val Trp His Ser			
610	615	620	
Ala Ala Gln Ala Ser Tyr Val Asp Leu Pro Val Tyr			
625	630	635	

<210> 3

<211> 25

<212> PRT

<213> Stenotrophomonas maltophilia

<220>

<221> PEPTIDE

<222> (1)..(25)

<400> 3

Val Pro Thr Met Trp Leu Gln Gly Leu Trp Asp Gln Glu Asp Met Trp  
1 5 10 15

Gly Ala Asn His Ala Tyr Gln Ala Met  
20 25

<210> 4

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: K1 primer

<400> 4

tgggaycarg argayatgtg ggg

23

<210> 5

<211> 8

<212> PRT

<213> Stenotrophomonas maltophilia

<220>

<221> PEPTIDE

<222> (1)..(8)

<400> 5

Trp Asp Gln Glu Asp Met Trp Gly

1

5

<210> 6

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: K-Nde I-4  
primer

<400> 6

ggaattccat atgcatgtgc gtgccgtagc

30

<210> 7

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: K-BamH I-1  
primer

<400> 7

cgcggtatcct cagtacaccg gcaggtc

27

【図面の簡単な説明】

【図 1】 実施例 5 で行った本発明の 1 態様である  $\beta$ -ラクタムアシラーゼ遺伝子の発現ベクターの構築図

【図 2】 試験例 1 で行ったアモキシシリンの合成活性の比較結果を示すグラフ

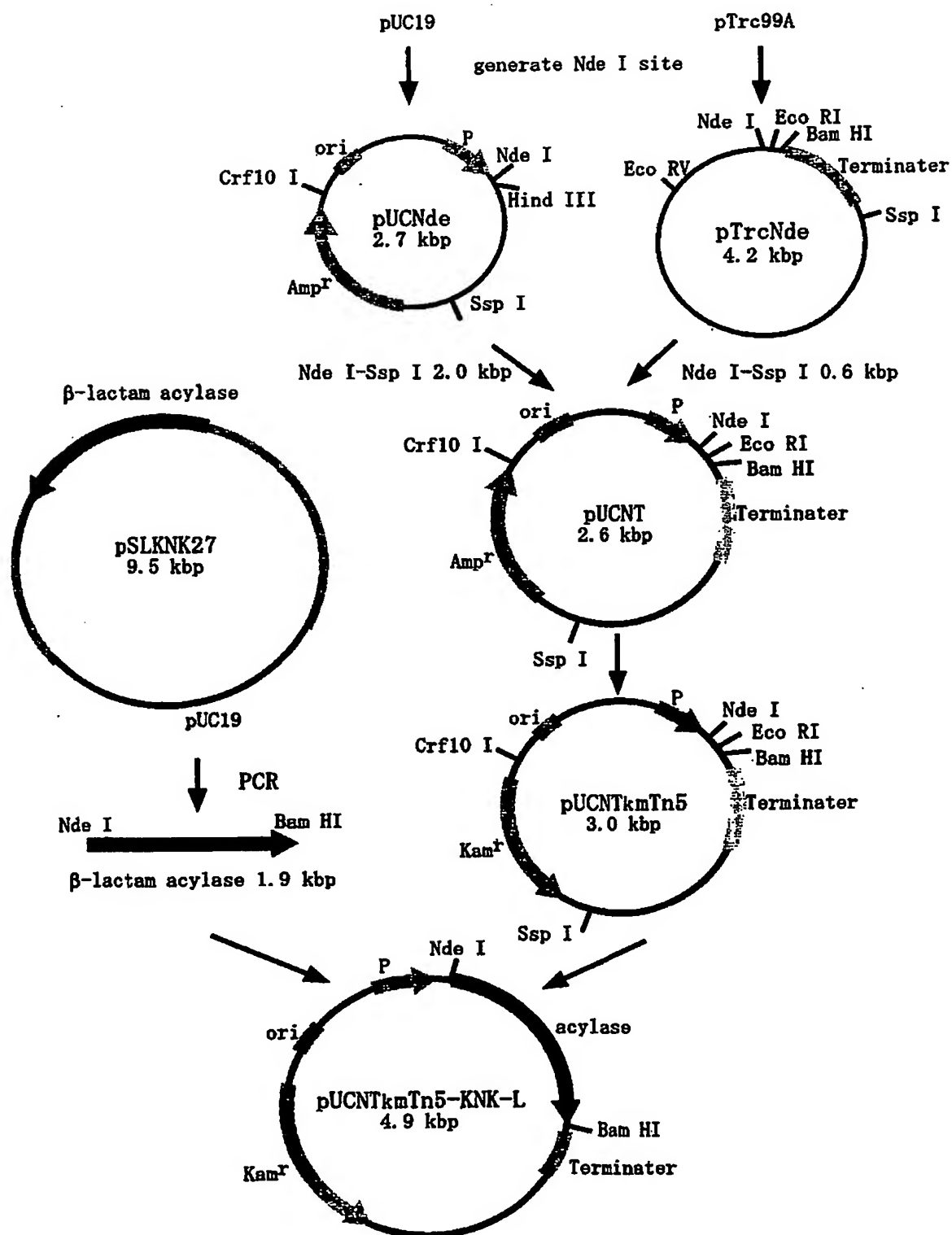
【図 3】 試験例 3 で行ったアモキシシリンの分解活性の比較結果を示すグラフ

【図 4】 試験例 1 で行ったヒドロキシフェニルグリシンメチルエステル (H P G O M e) の分解活性の比較結果を示すグラフ

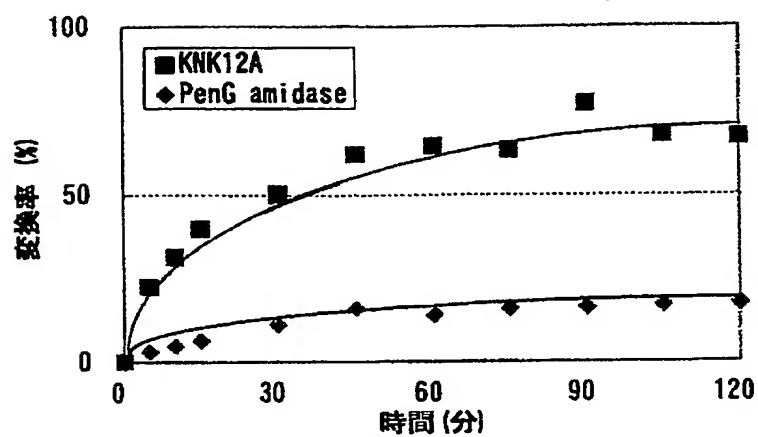
【書類名】

図面

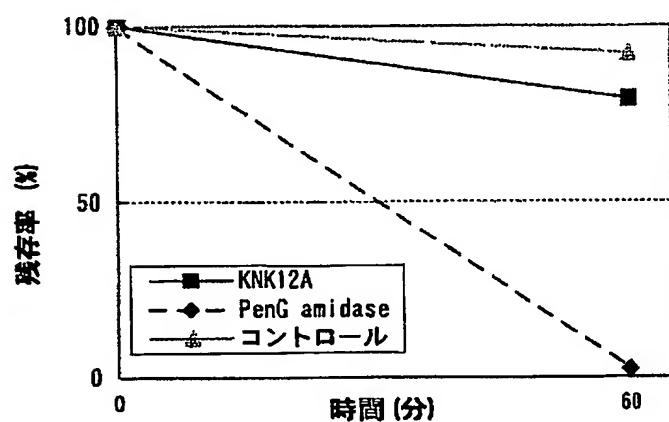
【図 1】



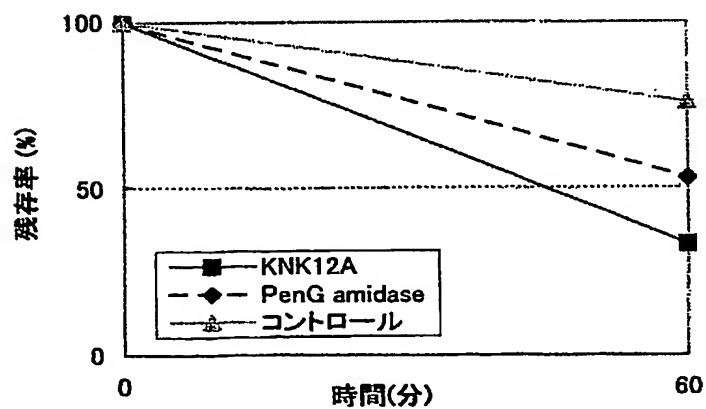
【図2】



【図3】



【図4】



## 【書類名】

要約書

## 【要約】

【課題】 活性の高い $\beta$ -ラクタムアシラーゼタンパク質、当該 $\beta$ -ラクタムアシラーゼタンパク質をコードする遺伝子、当該遺伝子を有する組換えベクター、当該組換えベクターを含む形質転換体、および当該 $\beta$ -ラクタムアシラーゼを用いたアモキシシリン等の $\beta$ -ラクタム系抗生物質製造方法を提供することである。

【解決手段】 ステノトロフォモナス マルトフィリア (*Stenotrophomonas maltophilia*) の $\beta$ -ラクタムアシラーゼ遺伝子をクローニングしてDNA塩基配列及びそれから予想されるアミノ酸配列を決定し、ステノトロフォモナス $\beta$ -ラクタムアシラーゼ遺伝子を取得した。この遺伝子がコードするタンパク質は分子量約70 kDaのタンパク質をコードしていることが判明し、 $\beta$ -ラクタムアシラーゼ活性を有し、フェニル酢酸等に阻害されることなくアモキシシリンを効率よく生産することができた。

## 【選択図】

なし

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2002-165722
受付番号	50200823865
書類名	特許願
担当官	第五担当上席 0094
作成日	平成14年 6月 7日

<認定情報・付加情報>

【提出日】	平成14年 6月 6日
-------	-------------

次頁無

特願 2002-165722

出願人履歴情報

識別番号

[000000941]

1. 変更年月日      1990年   8月 27日  
  [変更理由]      新規登録  
                    住 所      大阪府大阪市北区中之島3丁目2番4号  
                    氏 名      鐘淵化学工業株式会社
2. 変更年月日      2003年   4月   7日  
  [変更理由]      名称変更  
                    住所変更  
                    住 所      大阪府大阪市北区中之島3丁目2番4号  
                    氏 名      鐘淵化学工業株式会社
3. 変更年月日      2003年   4月   7日  
  [変更理由]      名称変更  
                    住 所      大阪府大阪市北区中之島3丁目2番4号  
                    氏 名      鐘淵化学工業株式会社